

**ЕКСПРЕСІЯ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ RUNX2, p21, CYD1, MMP-2
В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ПРОТЯГОМ 14-18 ДІБ ПРЕНАТАЛЬНОГО РОЗВИТКУ В НОРМІ
ТА ПІД ВПЛИВОМ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ**

¹Дніпровський державний медичний університет (м. Дніпро, Україна)

²Приватний заклад вищої освіти «Дніпровський інститут медицини та громадського здоров'я»
(м. Дніпро, Україна)

³ТОВ «Дніпровський медичний інститут традиційної та нетрадиційної медицини»
(м. Дніпро, Україна)

⁴Комунальне некомерційне підприємство «Клінічна лікарня швидкої медичної допомоги»
Дніпровської міської ради (м. Дніпро, Україна)

dovgalgem@i.ua

Свинець – одна з найстаріших та найбільш розповсюджених промислових отрут, який присутній у повітрі, воді та продуктах харчування. Печінка є одним із найбільш вразливих органів в пре- та постнатальному онтогенезі. Метою дослідження було визначення експресії спектру імуногістохімічних маркерів в печінці плодів щурів на 14, 16 та 18 добу пренатального періоду в нормі та після впливу ацетату свинцю протягом вагітності. Самицям щурів лінії Wistar з першого дня вагітності вводили ацетат свинцю в водному розчині у дозі 20 мг/кг per os щодня, контролем були інтактні плоди. Основні механізми порушення розвитку печінки під впливом ацетату свинцю – це пригнічення гемопоезу, затримка формування паренхіми й судин. Морфологічні зміни в гепатоцитах протягом 14-18 діб пренатального онтогенезу – це наростання дистрофічних явищ, що посилюються в напрямку периферичних частин органу. Активна експресія маркеру RUNX2 в нормі відбувалась в гепатоцитах та ендотеліоцитах печінки з тенденцією до підвищення. Маркер MMP2 демонстрував слабку реакцію в гепатоцитах та ендотеліоцитах майже без динаміки. Маркер p21 показав середню інтенсивність реакції в гепатоцитах з тенденцією до підвищення, та високу – в ендотеліоцитах. Маркер CYD1 експресувався слабо в гепатоцитах та ендотеліоцитах, повне зникнення його експресії в печінковому епітелії відбувалось к 18 добі, але він виявився в зірчастих клітинах печінки. Після впливу ацетату свинцю протягом пренатального періоду експресія маркеру RUNX2 та p21 в гепатоцитах зменшувалась. Токсикант майже не впливав на рівень синтезу маркеру RUNX2 та CYD1 в ендотеліальних клітинах печінки, тоді як експресія маркеру p21 зменшувалась в обох типах клітин. Ми вважаємо, що токсикант в пренатальному періоді не впливає істотно на експресію факторів, що контролюють цитокінез в печінковому епітелії, але пригнічує регенераційні можливості печінки, які пов'язані з регуляцією через фактор p21.

Ключові слова: печінка, пренатальний період, щури, ацетат свинцю, імуногістохімічні маркери.

Зв'язок публікацій з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження виконано згідно теми наукової роботи кафедри анатомії людини Дніпровського державного медичного університету: «Морфогенез органів та систем організму людини та

експериментальних тварин в онтогенезі в нормі та під впливом зовнішніх чинників», № державної реєстрації 01170006976.

Вступ. Свинець – одна з найстаріших та найбільш розповсюджених промислових отрут, який присутній у повітрі, воді та продуктах харчування. Механізм шкідливого впливу свинцю обумовлений його зарядом та розмірами, що такі ж самі, що й розміри іонів кальцію. Також іони свинцю схожі на іони цинку та заліза. Вони спроможні довгостроково замінювати іони кальцію, цинку, заліза в біохімічних реакціях, викликаючи блокування багатьох ензимів та тривале пошкодження організму [1, 2]. Сполуки свинцю долають плацентарний бар'єр та впливають на внутрішньоутробний розвиток органів та систем [2, 3, 4, 5], наслідки їх дії помітні в постнатальному періоді, навіть якщо дія токсиканту обмежувалась періодом вагітності [6]. У попередніх дослідженнях доведені різноманітні відхилення при впливі токсиканту до вагітності та під час вагітності. Виявилася, що печінка є одним із найбільш вразливих органів в пре- та постнатальному онтогенезі [2, 3, 5, 6]. Одним з сучасних методів дослідження молекулярно-біологічних особливостей розвитку тканин та органів є імуногістохімічний. В наших попередніх роботах ми продемонстрували зміни в експресії деяких маркерів в печінці протягом пренатального та раннього постнатального періоду під впливом ацетату свинцю [3, 5, 6]. Робота є частиною циклу досліджень молекулярно-біологічних властивостей печінки при нормальному онтогенезі та після впливу свинцю.

Мета дослідження – визначення експресії спектру імуногістохімічних маркерів в печінці щурів в пренатальному житті в нормі та після впливу ацетату свинцю протягом вагітності.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведено на самицях щурів лінії Wistar. Тварин утримували за стандартних умов віварію ДДМУ: температура повітря 22±2°C, вологість повітря 55±15%, 12-годинний світлий/темний цикл, вільний доступ до води та їжі. Матеріалом дослідження слугувала печінка інтактних зародків (група контролю) на 14-ту, 16-ту та 18-ту добу пренатального розвитку; печінка зародків від самиць, що отримували ацетат свинцю протягом вагітності. В експерименті було використано по 2 самиці в групах для кожного строку, загалом 12 тварин. Самицям з першого дня встановлення ва-

гітності вводили ацетат свинцю в водному розчині у дозі 20 мг/кг per os щодня. Після евтаназії цілі плоди або печінку плодів фіксували 10% формаліном і заливали у парапласт. Гістологічні зрізи (товщиною 5 мкм) монтували на скельця SuperFrost Plus.

З метою відновлення антигенних властивостей тканини проводили термічну індукцію відновлення епітопу шляхом нагрівання скельця в цитратному буфері після депарафінізації зрізів. Інкубацію з первинними антитілами проводили у вологих камерах при температурі 23-25° С протягом 30 хв. Спектр антитіл включав маркери (поліклон, LabVision): CYD1 (cytokinesis defective 1) – фактор, що регулює цитокінез, RUNX2 (runt-related transcription factor 2) – протеїн, що має регулюючу роль у проліферації клітин при вході та виході з клітинного циклу, p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) – внутрішньоклітинний білок-інгібітор циклін-залежної кинази 1A, грає критичну роль у реакції на пошкодження ДНК, MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) – матрична металопротеїназа-2.

Титр антитіл був обраний індивідуально для кожного маркера. Наступний етап імуногістохімічного дослідження проводили за допомогою системи візуалізації UltraVision Quanto (LabVision). Ідентифікацію здійснювали шляхом застосування хромогену DAB під контролем мікроскопа від 20 сек до 3 хв до появи темно-коричневого забарвлення конкретних структур. Зрізи додатково фарбували гематоксиліном Майєра.

Експерименти проводилися відповідно до вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006 р.).

Результати дослідження та їх обговорення.

Контрольна група, 14 доба пренатального розвитку. В цей термін починала формуватися часткова будова печінки. На поверхні органу з'являлися борозни, що відокремлювали частки. На світлооптичному рівні був помітний процес утворення елементів крові, який охоплював всі ділянки печінки. Накопичення кровотворних клітин відбувалося в просторах Дісе, при дослідженні на гістологічних препаратах клітини крові виглядали як накладені на периферичні частини печінкових балок, або розташовані

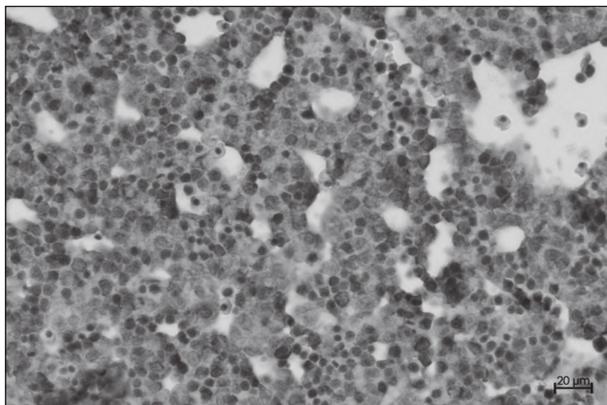


Рисунок 1 – Імуногістохімічна реакція на RUNX2 в печінці зародка щура на 14 добу ембріогенезу в нормі. Додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. 36.: ок. x10, об. x20.

поверх них, внаслідок того, що простори були вузькі. Спостерігалась неоднорідність архітектури печінкової тканини, що було пов'язаним з формуванням в ній крупних внутрішньоорганних судин. Формувався контакт печінкової паренхіми з мезенхімою задньої стінки тулуба. Частково ця тканина була вбудована в склад органу, що має значення для подальшого формування в печінці клітин сполучної тканини, гладком'язових клітин судин та жовчних протоків, зірчастих клітин, які ще не виявлялися.

Маркер RUNX2 демонстрував виразну, але не рівномірну експресію. Більш, ніж половина гепатоцитів активно накопичували гранули барвника (рис. 1). В ендотеліальних клітинах печінки спостерігалась висока інтенсивність реакції на цей маркер. Таким чином, експресія маркеру RUNX2 виявляється в інших типах клітин, аніж остеобласти та ендотеліоцити, як це було описано раніше [7, 8].

Експресія маркеру MMP2 виявлялася при збільшенні зображення до 400 разів та більше у вигляді дрібних гранул, нерівномірно розподілених в цитоплазмі епітеліальних клітин паренхіми, що дозволяло оцінити її як дуже слабку (-/+). В ендотеліальних клітинах печінки концентрація барвника була більш виразною, але не досягала середнього рівня інтенсивності забарвлення.

Накопичення гранул, що відображали інтенсивність експресії маркеру p21, відбувалося у гепатоцитах переважно у периферичних ділянках цитоплазми. У центральних регіонах органу інтенсивність реакції була середньою, в той час у ділянках під печінковою капсулою кількість гранул в гепатоцитах була дещо більшою. Ендотеліальні клітини, які вкривали печінкові балки, демонстрували однорідну високу інтенсивність реакції. Острівці кровотворення також демонстрували позитивну реакцію на цей маркер переважно середнього ступеня виразності.

Маркер CYD1 експресувався не значно в печінковій паренхімі. В цей термін дослідження він виявлявся в цитоплазмі гепатоцитів у вигляді дрібних гранул, але в частині епітеліальних клітин забарвлення ми не спостерігали. Ендотеліальні клітини також демонстрували слабке зв'язування з маркером CYD1.

Група після впливу ацетату свинцю, 14 доба пренатального розвитку. Процеси гемопоезу були суттєво пригнічені, іноді до повної відсутності гемопоетичних клітин в окремих полях зору. Якщо ми спостерігали початок утворення клітин крові в печінці у зародків цієї групи, то ця картина значно відрізнялася від норми, де накопичення гемопоетичних клітин відбувалося відносно рівномірно у всьому органі. Після впливу токсиканту кровотворення, якщо й розпочиналося, то цей процес охоплював лише центральні ділянки органу, в периферичних зонах він був майже відсутнім. Порушувалося формування печінкової капсули та затримувалися процеси міграції клітин з тулубної мезенхіми.

Після впливу токсиканту ми спостерігали зниження експресії маркеру RUNX2 в цитоплазмі гепатоцитів, порівняно до норми. В ендотеліальних клітинах печінки інтенсивність реакції не змінювалась. Враховуючи наявність дрібних гранул, позитивних на маркер MMP2, в цитоплазмі гепатоцитів та ендотеліоцитів, ми не могли зробити висновки про зміни в інтенсивності експресії цього маркеру на цей час.

Убіквітално в органі гепатоцити демонстрували середній ступінь виразності реакції з маркером CYD1 (рис. 2). Помітно більш інтенсивно забарвленими виглядали гепатоцити, що вступили на шлях мітозу та демонстрували метафазну пластинку. Таким чином, токсикант не впливає істотно на експресію факторів, що регулюють цитокінез. В ендотеліальних клітинах печінки реакція з маркером CYD1 була незмінно виразною.

Гепатоцити демонстрували неоднорідність в ступеню експресії маркеру p21 як в центральних, так і в периферичних відділах органу. В цілому, печінковий епітелій демонстрував істотне зниження реакції з цим маркером, а ендотеліальні клітини печінки лише незначне її зменшення. Можливо, що токсикант пригнічує регенераційні можливості печінки, які пов'язані з регуляцією через фактор p21 [9].

Контрольна група, 16 доба пренатального розвитку. При гістологічному дослідженні виявлявся подальший розвиток печінки в вигляді диференціювання часток. В центрі часток формувалися крупні внутрішньоорганні судини. Печінкова тканина загалом ставала більш щільною, з рівномірно розташованими елементами кровотворного ряду. Печінкові часточки, які розвивалися навколо центральної вени, набували вигляду, що наближався до будови зрілої печінкової часточки. Балки в них були розташовані щільно, виявлялися лише окремі синусоїди. Взагалі судинні структури відрізнялися від попередньої стадії, бо первинні синусоподібні структури заміщувалися типовими центральними венами, синусоїдами, міжчасточковими та міжчастковими судинами. Гемопоетичні клітини були розташовані скупчено, уздовж балок.

В більшості гепатоцитів маркер RUNX2 демонстрував виразну експресію. В тканині розподіл барвника не виглядав рівномірним: групи клітин з 3-4 гепатоцитів з високим рівнем накопичення гранул були оточені епітеліальними клітинами з середнім ступенем виразності імуногістохімічної реакції. Зберігалась інтенсивна реакція в ендотеліальних клітинах печінки. Експресія маркеру MMP2 в гепатоцитах дещо посилювалася порівняно з 14 добою пренатального розвитку, як й маркеру p21. Центральні ділянки органу на цей час демонстрували рівномірну інтенсивну імуногістохімічну реакцію. Ендотеліальні клітини печінки зберігали середній рівень експресії маркеру MMP2 та високий – маркеру p21. Маркер CYD1 практично не виявлявся в цитоплазмі гепатоцитів в цей термін дослідження. З'явилися окремі, позитивні на маркер, відросчасті клітини. Максимальну реакцію на маркер ми виявили в клітинах такого типу, що були розташовані поблизу судин та під ендотелієм, що вкриває печінкові балки. Це популяція відросчастих клітин, що активно проліферує, на нашу думку, відноситься до зірчастих клітин або клітин Ito. Вони містили кількість гранул, яка дозволила оцінити таку реакцію як середню. Локалізація та форма їх були ідентичними до тих, що ми виявляли в наших попередніх дослідженнях за допомогою маркера α SMA [3]. Імуногістохімічна реакція на маркер CYD1 була незмінною та слабкою в ендотеліальних клітинах.

Група після впливу ацетату свинцю, 16 доба пренатального розвитку. В периферичних та інколи в центральних ділянках печінки ми спостерігали зміну

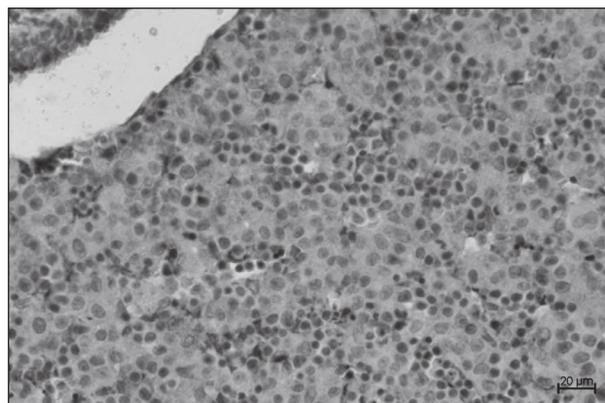


Рисунок 2 – Імуногістохімічна реакція на CYD1 в печінці зародка щура на 14 добу ембріогенезу після впливу ацетату свинцю. Додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. Зб.: ок. $\times 10$, об. $\times 20$.

орієнтації печінкових балок, вони могли бути зорієнтовані паралельно або формувати спіралеподібні структури, при цьому синусоїди були здавленими, в них іноді не прослідковувалися елементи крові. Будова гепатоцитів органу порушувалась не значно. В більшості клітин зменшувалась щільність цитоплазми, в окремих клітинах печінкового епітелію спостерігалось формування вакуолей.

В печінці розподіл маркеру RUNX2 був неоднорідним: інтенсивність накопичення барвника в цитоплазмі гепатоцитів коливалася від ледь помітної до виразної. В цілому, в печінковій паренхімі інтенсивність реакції ми оцінили як середню та дещо знижену, порівняно до норми. Значна кількість гранул барвника була виявлена в мезенхімних клітинах, що оточують острівці кровотворення. Кількість острівців та клітин крові в них були значно зменшені, порівняно до норми. Зберігалась висока інтенсивність реакції в ендотеліальних клітинах печінки. В цитоплазмі гепатоцитів виявлялися дрібні, але помітні, позитивні на маркер MMP2, гранули, що займали ділянки поблизу цитолемі. Кількість таких гранул коливалася, але загалом таку інтенсивність реакції в печінковому епітелії ми оцінили як слабку. Порівняно до норми експресія маркеру незначно посилювалася, що відрізнялося від попереднього строку спостереження. Можливо, посилювався накопичувальний ефект з боку токсиканту. В печінці епітеліальні клітини паренхіми загалом мали середній ступінь накопичення

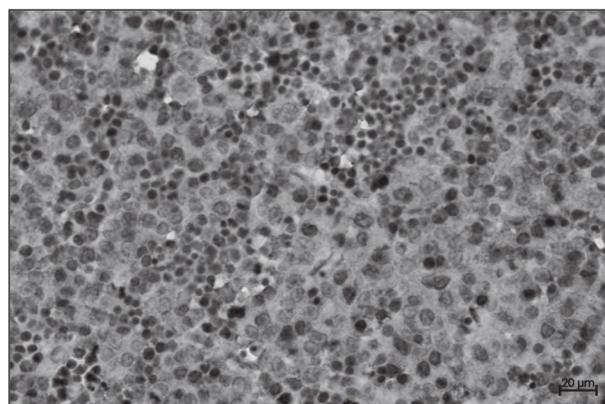


Рисунок 3 – Імуногістохімічна реакція на p21 в печінці зародка щура на 16 добу ембріогенезу після впливу ацетату свинцю. Додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. Зб.: ок. $\times 10$, об. $\times 40$.

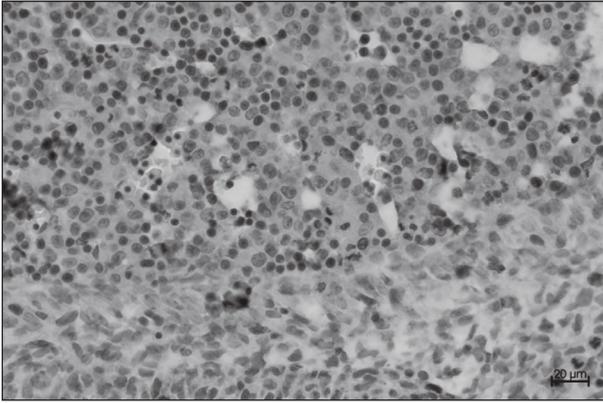


Рисунок 4 – Імуногістохімічна реакція на CYD1 в печінці зародка щура на 18 добу ембріогенезу в нормі. Додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. Зб.: ок. $\times 10$, об. $\times 40$.

маркеру CYD1. Більш виразну реакцію з маркером демонстрували відросчасті клітини. Маркер p21, на відміну від норми, розподілявся нерівномірно, окремі клітини печінкового епітелію мали значну концентрацію гранул барвника, поряд з ділянками з відносно слабкою реакцією. Такі гепатоцити демонстрували перинукліарне кільце, де накопичувався маркер (рис. 3). В клітинах, що вступили на шлях мітозу, інтенсивність реакції була високою, як в нормі. Загалом, ми відмітили зниження експресії цього маркеру в паренхімі печінки та ендотеліальних клітинах.

Контрольна група, 18 доба пренатального розвитку. Формувалася типова структура печінкових часточок, вигляд яких відрізнявся від зрілих, завдяки насиченості елементами крові, що диференціюються в просторах Дісе. Гепатоцити в печінкових балках виглядали одноманітними, з округлим ядром та світлою дрібнозернистою однорідною цитоплазмою. Клітини крові формували скупчення в периферичних та проміжних частинах часточок.

Щодо маркерів, то експресія RUNX2 незначно підвищувалась в печінковому епітелії порівняно до попереднього строку спостереження. Маркер MMP2 та p21 зберігали рівень експресії та розподіл такими, як були на 16 добу. Маркер CYD1 відмічав лише відросчасті клітини печінки, скоріше за все, клітини Іто; були практично відсутні позитивні на цей маркер епітеліальні та ендотеліальні клітини (рис. 4).

Група після впливу ацетату свинцю, 18 доба пренатального розвитку. На світлооптичному рівні ми спостерігали апоптотичні та дистрофічні зміни окремих гепатоцитів, порушення форми печінкових балок та розвитку судин. Також відбувалося пригнічення гемопоєзу. В ділянках, що піддалися вираз-

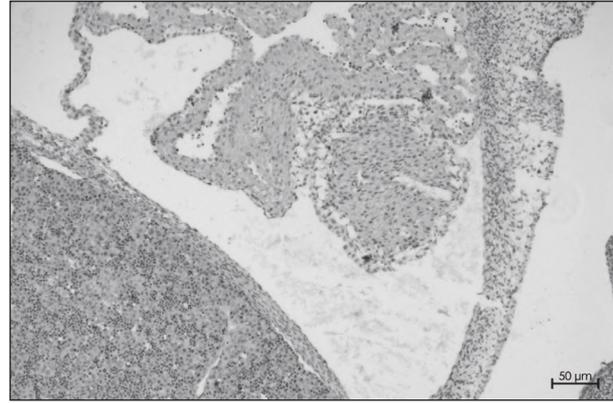


Рисунок 5 – Імуногістохімічна реакція на MMP2 в печінці лівому передсерді зародка щура на 18 добу ембріогенезу після впливу ацетату свинцю. Додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. Зб.: ок. $\times 10$, об. $\times 10$.

ним апоптотичним змінам, не спостерігалось клітин крові, що мають звичайний вигляд. Зберігалась знижена, порівняно до норми, експресія маркеру RUNX2 в гепатоцитах. Інтенсивне накопичення барвнику ми спостерігали в ендотеліальних клітинах печінки. Рівень синтезу маркеру MMP2 був таким, як й на попередньому строку дослідження (рис. 5). Експресія маркеру p21 була зниженою, порівняно до норми, що показало збереження тенденції, яка почала формуватися раніше.

Висновки. Протягом 14-18 діб пренатального періоду у щурів активна експресія маркеру RUNX2 в нормі відбувається в гепатоцитах та ендотеліоцитах печінки з тенденцією до підвищення. Маркер MMP2 демонстрував слабку реакцію в гепатоцитах та ендотеліоцитах майже без динаміки. Маркер p21 показав середню інтенсивність реакції в гепатоцитах з тенденцією до підвищення, та високу – в ендотеліоцитах. Маркер CYD1 експресувався слабо в гепатоцитах та ендотеліоцитах, повне зникнення його експресії в печінковому епітелії відбувалось к 18 добі, але він виявився в зірчастих клітинах печінки. Після впливу ацетату свинцю протягом пренатального періоду експресія маркеру RUNX2 та p21 в гепатоцитах зменшується. Токсикант майже не впливає на рівень синтезу маркеру RUNX2 та CYD1 в ендотеліальних клітинах печінки, тоді як експресія маркеру p21 зменшується в обох типах клітин.

Перспективи подальших досліджень. Використати інші імуногістохімічні маркери для вивчення пренатального та постнатального розвитку печінки під впливом ацетату свинцю, а також проводити пошук протектантів.

Література

1. Aleksiihchuk VD, Sokurenko LM, Omelchuk ST. Osoblyvosti vplyvu nanochastok sulfidu ta nitratu svyntsu na orhanizm eksperymentalnykh tvaryn u rizni periody doslidzhennia ta metody korektsii yikh nehatyvnoi dii. Svit medytsyny ta biolohii. 2015;54(4):97-100. [in Ukrainian].
2. Vylegzhaniina TA. Vliyanie acetata svinca na razvitie pecheni krysa. Original'nye nauchnye publikacii. 2015;44-48. [in Russian].
3. Dovhal HV, Dovhal MA, Romanenko OA. Pathomorphology of fetal and mature liver under the lead intoxication and after the correction: the review of experimental data. Pathologia. 2019;1(45):139-144. DOI: 10.14739/2310-1237. 2019.1.166497.
4. Dovhal HV, Dovhal MA, Shevchenko IV. Porushennia morfohenezu sertsia shchuriv pid vplyvom atsetatu svyntsiu ta za umov korektsii. Visnyk problem biolohii i medytsyny. 2018;4(147):271-276. DOI: 10.29254/2077-4214-2018-4-2-147-271-276. [in Ukrainian].
5. Dovhal HV, Dovhal MA, Romanenko OA. The expression of immunohistochemical markers in the fetal liver after maternal exposure of lead acetate and under the correction. Science Rewiew. 2017;7:17-19. Available from: http://archive.ws-conference.com/wp-content/uploads/pw_0567.pdf.
6. Dovhal HV, Dovhal MA, Romanenko OA, Zharikov MYu, Romanenko KL. Ekspresiiia imunohistokhimichnykh markeriv v pechintsi shchuriv v pershyi tyzhen zhyttia pislia prenatalnogo vplyvu atsetatu svyntsiu ta za umov korektsii. Visnyk problem biolohii i medytsyny. 2020;1(155):297-301. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-1-155-297-301. [in Ukrainian].

- Zhang L, Jiao G, Ren S, Zhang X, Li C, Wu W, Wang H, Liu H, Zhou H, Chen Y. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells enhance fracture healing through the promotion of osteogenesis and angiogenesis in a rat model of nonunion. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):38. DOI: 10.1186/s13287-020-1562-9.
- Ding D, Zhang P, Liu Y, Wang Y, Sun W, Yu Z, Cheng Z, Wang Y. Runx2 was correlated with neurite outgrowth and schwann cell differentiation, migration after sciatic nerve crush. *Neurochem Res.* 2018;43(12):2423-2434. DOI: 10.1007/s11064-018-2670-0.
- Moniaux N, Lacaze L, Gothland A, Deshayes A, Samuel D, Faivre J. Cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 function as critical regulators of liver regeneration following 90% hepatectomy in the rat. *World J Hepatol.* 2020;12(12):1198-1210. DOI: 10.4254/wjh.v12.i12.1198.

ЕКСПРЕСІЯ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ RUNX2, p21, CYD1, MMP-2 В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ПРОТЯГОМ 14-18 ДІБ ПРЕНАТАЛЬНОГО РОЗВИТКУ В НОРМІ ТА ПІД ВПЛИВОМ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ

Довгаль Г. В., Довгаль М. А., Романенко О. А., Жаріков М. Ю., Романенко К. Л.

Резюме. Свинцев – одна з найстаріших та найбільш розповсюджених промислових отрут, який присутній у повітрі, воді та продуктах харчування. Печінка є одним із найбільш вразливих органів в пре- та постнатальному онтогенезі.

Метою дослідження було визначення експресії спектру імуногістохімічних маркерів в печінці плодів щурів на 14, 16 та 18 добу пренатального періоду в нормі та після впливу ацетату свинцю протягом вагітності.

Самицям щурів лінії Wistar з першого дня вагітності вводили ацетат свинцю в водному розчині у дозі 20 мг/кг per os щодня, контролем були інтактні плоди. Основні механізми порушення розвитку печінки під впливом ацетату свинцю – це пригнічення гемопоезу, затримка формування паренхіми й судин.

Морфологічні зміни в гепатоцитах протягом 14-18 діб пренатального онтогенезу – це наростання дистрофічних явищ, що посилюються в напрямку периферичних частин органу. Активна експресія маркеру RUNX2 в нормі відбувалась в гепатоцитах та ендотеліоцитах печінки з тенденцією до підвищення. Маркер MMP2 демонстрував слабку реакцію в гепатоцитах та ендотеліоцитах майже без динаміки. Маркер p21 показав середню інтенсивність реакції в гепатоцитах з тенденцією до підвищення, та високу – в ендотеліоцитах. Маркер CYD1 експресувався слабо в гепатоцитах та ендотеліоцитах, повне зникнення його експресії в печінковому епітелії відбувалось к 18 добі, але він виявився в зірчастих клітинах печінки.

Після впливу ацетату свинцю протягом пренатального періоду експресія маркеру RUNX2 та p21 в гепатоцитах зменшувалась. Токсикант майже не впливав на рівень синтезу маркеру RUNX2 та CYD1 в ендотеліальних клітинах печінки, тоді як експресія маркеру p21 зменшувалась в обох типах клітин.

Ми вважаємо, що токсикант в пренатальному періоді не впливає істотно на експресію факторів, що контролюють цитокінез в печінковому епітелії, але пригнічує регенераційні можливості печінки, які пов'язані з регуляцією через фактор p21.

Ключові слова: печінка, пренатальний період, щури, ацетат свинцю, імуногістохімічні маркери.

EXPRESSION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS RUNX2, p21, CYD1, MMP-2 IN THE LIVER OF RATS DURING 14-18 DAYS OF PRENATAL DEVELOPMENT IN THE NORMAL AND UNDER THE INFLUENCE OF LEAD ACETATE

Dovhal H. V., Dovhal M. A., Romanenko O. A., Zharikov M. Yu., Romanenko K. L.

Abstract. The aim of the study was to determine the expression of the spectrum of immunohistochemical markers in the liver in the prenatal period of rats after exposure to lead acetate during pregnancy. From the first day of pregnancy, female Wistar rats were exposed to lead acetate in an aqueous solution at a dose of 20 mg/kg per os daily. The liver of rat fetuses underwent the immunohistochemical analysis on the 14th, 16th and 18th day of prenatal life; the control was the liver of intact rat fetuses.

The RUNX2 marker showed a clear but not uniform expression. More than half of the hepatocytes actively accumulated dye granules. High intensity of reaction to this marker was observed in endothelial cells of the liver. Thus, RUNX2 expression is detected in cell types other than osteoblasts and endotheliocytes, as previously described. The expression of the MMP2 was detected as very small granules accumulation, unevenly distributed in the cytoplasm of epithelial cells of the parenchyma, which allowed to estimate it as very weak. In liver endothelial cells, the concentration of the dye was more pronounced, but did not reach the moderate level of intensity. The accumulation of granules, which reflected the expression intensity of the marker p21, occurred in hepatocytes mainly in the peripheral regions of the cytoplasm. In the central regions of the liver the intensity of the reaction was moderate, while in the areas under the liver capsule the number of granules in hepatocytes was slightly higher. Endothelial cells that covered the liver beams showed the uniform high intensity of the reaction. Hematopoietic islets also showed a positive moderate response to this marker. The CYD1 was not significantly expressed in the liver parenchyma. It was detected in the cytoplasm of hepatocytes, but in some epithelial cells, we did not observe CYD1 marker. Endothelial cells also showed weak binding to the CYD1.

After exposure to the toxicant, we observed the decrease in the expression of the marker RUNX2 in the cytoplasm of hepatocytes compared to normal liver. In the cytoplasm of hepatocytes were found small but noticeable positive reaction for MMP2, granules occupying areas near the cytolemma. The number of such granules fluctuated, we estimated such intensity of reaction in a hepatic epithelium as weak. Ubiquitously in the organ, hepatocytes showed the moderate reaction with the marker CYD1. Hepatocytes, which entered the path of mitosis and showed a metaphase plate, looked noticeably more stained. Thus, the toxicant does not significantly affect the expression of factors that regulate cytokinesis. The reaction with the marker CYD1 seemed to be intact in the liver endothelial cells. Hepatocytes showed heterogeneity in the degree of expression of the p21 marker in both central and peripheral parts of the organ. Generally, the hepatic epithelium showed a significant decrease in expression of this marker, but

the liver endothelial cells only a slight decrease. It is possible that the toxicant inhibits the regenerative capacity of the liver, which is associated with regulation through factor p21.

We conclude that during 14-18 days of the prenatal period in rats, the active expression of RUNX2 normally occurs in hepatocytes and endotheliocytes of the liver with a tendency to increase. The MMP2 showed a weak response in hepatocytes and endothelial cells with almost no dynamics. The p21 marker showed the moderate reaction in hepatocytes with a tendency to increase, and high expression – in the endothelial cells. CYD1 was poorly expressed in hepatocytes and endothelial cells, disappearance of expression in the hepatic epithelium occurred by day 18, but it was found in stellate liver cells. After exposure to lead acetate during the prenatal period, the expression of RUNX2 and p21 in hepatocytes decreases. The toxicant has almost no effect on the level of RUNX2 and CYD1 synthesis in liver endothelial cells, whereas the expression of p21 decreases in both cell types.

Key words: liver, prenatal period, rats, immunohistochemical markers, lead acetate.

ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Dovhal H. V.: 0000-0002-0594-7370 ^{ABEF}

Dovhal M. A.: 0000-0003-4919-5673 ^{BCD}

Romanenko O. A.: 0000-0001-9141-4193 ^{BC}

Zharikov M. Yu.: 0000-0002-3638-0928 ^{BE}

Romanenko K. L.: 0000-0003-0539-0215 ^{BD}

Конфлікт інтересів:

Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

Адреса для кореспонденції

Довгаль Геннадій Володимирович

Дніпровський державний медичний університет

Адреса: Україна, 49044, м. Дніпро, вул. Володимира Вернадського, 9

Тел.: 0960222408

E-mail: dovgalgem@i.ua

A – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Рецензент – проф. Проніна О. М.

Стаття надійшла 22.02.2021 року

Стаття прийнята до друку 31.08.2021 року

DOI 10.29254/2077-4214-2021-3-161-258-262

УДК 612.3:591.39:661.852:661.782-092.9

¹Колосова І. І., ¹Руденко К. М., ²Люлько І. В., ²Топка Е. Г., ²Коссе В. А.,

²Філіппов Ю. А., ²Алексєєнко З. К.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТІВ ВПЛИВУ КАДМІЮ ХЛОРИДУ НА ЕМБРІОГЕНЕЗ ЩУРІВ НА РІЗНИХ ТЕРМІНАХ ВАГІТНОСТІ

¹Дніпровський державний медичний університет (м. Дніпро, Україна)

²Дніпровський медичний інститут традиційної і нетрадиційної медицини (м. Дніпро, Україна)

irakolosova0405@gmail.com

Пренатальний період розвитку є ключовим для стану здоров'я організму протягом не тільки раннього онтогенезу, але і всього подальшого життя. Природний нормальний перебіг ембріогенезу може бути порушено під впливом багатьох факторів зовнішнього середовища, які можуть негативно впливати на рівні клітин, змінювати диференціацію тканин та часто призводить до вад розвитку органів. У окремих районах Дніпропетровської області знайдено підвищене накопичення в ґрунті та питній воді солей кадмію, цинку, хрому, свинцю, марганцю та міді, які можуть бути в різних комбінаціях і концентраціях і зумовлювати несприятливий вплив на здоров'я населення. Метою дослідження було експериментальне визначення та порівняння показників ембріогенезу щурів під впливом низьких доз кадмію хлориду. В роботі представлено результати експериментального впливу низьких доз хлориду кадмію (1,0 мг/кг та

2,0 мг/кг) при ізольованому внутрішньошлунковому введенні на загальний хід ембріогенезу щурів. Оперативний забій відбувався на 13-й, 19-й та 20-й добі гестації. Можливу ембріотоксичну дію досліджуваних речовин оцінювали за наступними показниками: загальна ембріональна смертність, доїмплантаційна смертність, постїмплантаційна смертність, кількість живих плодів на 1 самицю. Аналіз отриманих результатів свідчить про виражений ембріотоксичний вплив хлориду кадмію на процеси ембріогенезу, що виявляється достовірним підвищенням показників загальної ембріональної смертності, доїмплантаційної та постїмплантаційної смертності порівняно з контрольною групою на всіх досліджуваних термінах ембріогенезу. Більш виражений ембріотоксичний вплив виявлено в групі ізольованої дії кадмію хлориду у дозі 2,0 мг/кг. Перспективним на наш погляд, є виявлення та порівняння ступеня накопичення кад-